Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. Walther Graumann

ZUR BLOCKKONTRASTIERUNG INTRAZYTOPLASMATISCHER GLYKOPROTEINE

Versuche mit einer modifizierten Eisenbindungsreaktion an der Gl. Submandibularis der Ratte

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

(Theoretische Medizin)

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

PAUL-JÜRGEN HÜLSER

aus Oberhausen

1980

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. Walther Graumann

ZUR BLOCKKONTRASTIERUNG INTRAZYTOPLASMATISCHER GLYKOPROTEINE

Versuche mit einer modifizierten Eisenbindungsreaktion an der Gl. Submandibularis der Ratte

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

(Theoretische Medizin)

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

PAUL-JÜRGEN HÜLSER

aus Oberhausen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Haselmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Arnold
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Staak

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Einleitung und Fragestellung 1

Material und Methoden 6

I. Lichtmikroskopische Untersuchungen 6

A) Fixierungsabhängigkeit der EBR am Paraffinschnitt 6

B) Fe^{+++}-Gehalt des Sols - Einfluß auf die EBR am Paraffinschnitt 8

C) Blockinkubation 8

1. Gewebeentnahme und Fixierung 8

2. Nachweisreaktionen 9

a) Blockinkubation in Eisenoxidhydratsol unter Zugabe von Schutzkolloiden oder kleinmolekularen bipolaren Verbindungen 9

b) Blockinkubation in Ferrirhodanidkomplex 9

c) Blockinkubation in Eisen-(III)-chloridlösungen 10

d) Schnittfärbung an EFL-eingebettetem Material 10

3. Kontrollreaktionen 11

II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen 11

A) Größenverteilung der Ferrihydroxidpartikel 11

B) Untersuchungen an der Gl. submandibularis der Ratte 12

Befunde 13

A) Einfluß der Fixierung auf die EBR am Paraffinschnitt 13

B) Einfluß des Fe^{+++}-Gehaltes des Ferrioxidhydratsols auf das Ergebnis der EBR am Paraffinschnitt 14

C) Versuche zur Blockinkubation 15

1. Zugabe von Schutzkolloiden oder kleinmolekularen bipolaren Verbindungen zum Ferrioxidhydratsol 15

2. Inkubation in molekulardispersen Lösungen von Eisen und Umwandlung in das Ferrioxidhydrat am Substratort 16

a) Ferrirhodanidkomplex als Vorläufer 16

b) Fe^{+++}-Ionen bze. $FeCl_3$-Moleküle als Vorläufer 16

Seite

3. Kontrollreaktionen 17
a) milde saure Hydrolyse 17
b) Methylierung 18
D) Elektronenmikroskopische Befunde 18
1. Größenverteilung der Ferrioxidhydratpartikel 18
2. Blockkontrastierung an der Gl. submandibularis der Ratte 18

Diskussion 21
A) Physikochemie von Substrat und Reagenz 21
1. Fixierungsabhängigkeit der EBR an der Gl. submandibularis der Ratte 21
2. Zusammensetzung des Sols hinsichtlich Teilchengröße und Fe^{+++}-Gehalt 23
B) Anpassung der EBR an die Bedingungen der Blockinkubation 25

Zusammenfassung 33

Literatur 35

Tabellen 50

Abbildungslegenden 54

Abbildungen 55

Lebenslauf 57

EINLEITUNG

Histochemisch können Glykoproteine prinzipiell über ihren Eiweiß- oder ihren Kohlenhydratanteil (= prosthetische Gruppe) erfasst werden. Da für die Proteinkomponente kaum geeignete Verfahren zur Verfügung stehen (LEV und GERARD, 1967; STOWARD, 1968; LEV, 1977; YOUNG und VAN LENNEP, 1978), erfolgt der Nachweis im allgemeinen über die Oligosaccharidseitenketten. Sofern diese saure Gruppen tragen, kommen als Nachweisreagenzien basische Farbstoffe in Betracht. Entsprechende Eigenschaften zeigt auch (im Gegensatz zu Ferro- oder Ferri-Ionen - LILLIE et al., 1973 -) das positiv geladene Eisenoxidhydratsol, das aber gegenüber den üblichen kationischen Verbindungen einige Besonderheiten aufweist:

1. Die Bindung an das Substrat läßt sich nicht ausschließlich durch elektrostatische Anziehung erklären. Vielmehr spielen noch sterische Momente in Form geometrischer und elektrostatischer Hinderung sowohl vonseiten des Substrates als auch des Reagenzes eine wichtige Rolle. Dies gilt auch hinsichtlich der Quantifizierbarkeit der Reaktion (MÜLLER und OLLENNU, 1964; GASIC et al., 1968; ARNOLD, 1971; GEYER und STIBENZ, 1974; GEYER et al., 1975; GOTHE, 1979).

2. Die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens und damit sein potentieller Wert für die Identifizierung auch geringer Substratmengen ist besonders hoch (TAYLOR und SAUNDERS, 1956; MOWRY, 1958; JIRGE, 1970; NARASIMHAM und KAMAT, 1970; ARNOLD, 1971; SONNTAG und ARNOLD, 1973; ARNOLD und KLESSEN, 1975).

In der Lichtmikroskopie schließt man der Inkubation in Eisenoxidhydratsol eine Farbreaktion an, bei der das gebundene Eisen in $K\,[Fe^{III}Fe^{II}](CN)_6$ (Berliner Blau) umgewandelt wird. Das als Eisenbindungsreaktion (EBR) bezeichnete Ver-

fahren hat breite Anwendung gefunden, nachdem es 1946 erstmals von HALE zur Darstellung saurer Mucopolysaccharide empfohlen worden ist. Aufgrund seines Gehaltes an Schwermetall ist das Eisenoxidhydratsol auch für die Kontrastierung in der Elektronenmikroskopie geeignet.

Die Brauchbarkeit der EBR wird durch Unklarheiten hinsichtlich ihrer Spezifität eingeschränkt (Zusammenfassungen bei CURRAN, 1964; PEARSE, 1968; GEYER, 1977). Eine Interpretation der Ergebnisse kann also sehr schwierig sein. In der Elektronenmikroskopie stehen ihrer Anwendung zusätzlich noch präparative Probleme entgegen: Die - "großen" - kolloidalen Partikel des Sols dringen praktisch nicht in fixiertes Gewebe ein bzw. präzipitieren an der Präparatoberfläche, so daß die EBR für Blockkontrastierungen ungeeignet erscheint (CURRAN et al., 1964, 1965; WETZEL et al., 1965, 1966; MATUKAS et al., 1967; ARNOLD, 1971; ARNOLD und HAGER, 1969; RAMBOURG, 1973). Am Ultradünnschnitt bewirkt die geringe Penetrationsfähigkeit andererseits nur eine außerordentlich labile Bindung der Solteilchen an das Substrat. Spülvorgänge u.ä. müssen sehr vorsichtig und schonend durchgeführt werden (ARNOLD, 1971), so daß eine hohe Rate unspezifisch adsorbierten elektronendichten Materials im Präparat verbleibt. Aus diesem Grund findet das Eisenoxidhydratsol in der Elektronenmikroskopie nur bei der Darstellung von Substraten an Zelloberflächen eine nennenswerte Anwendung (MARTINEZ-PALOMO, 1970; RAMBOURG, 1971).

Um die präparativen Schwierigkeiten zu bewältigen, wurden in der Vergangenheit zahlreiche Versuche unternommen, das ursprüngliche Verfahren den Bedingungen in der Elektronenmikroskopie anzupassen.

Am Ultradünnschnitt stellt offensichtlich das Einbettungsmittel die eigentliche Barriere für die Bindung der kolloidalen Partikel dar (ARNOLD, 1971; ARNOLD und HAGER, 1969). Zwar scheint die Kontrastierbarkeit nach Methacrylateinbettung besser zu sein als nach Epon oder Vestopal (CURRAN und CLARK, 1964; CURRAN et al., 1965; GEYER und WATZIG, 1969; HOSHINO und YAMADA, 1972); insgesamt ist das Ergebnis aber auch dann nicht zufriedenstellend. Eine gewisse Verbesserung gelingt durch partielles Herauslösen des Kunstharzes (THIERY, 1970) sowie - unter Vermeidung einer Einbettung - nach Anwendung der Cryo-Ultramikrotomie (PUVION und BERNHARD, 1975).

Entsprechend der Vorstellung, das Eindringen der kolloidalen Eisenlösung in Gewebeblöcke sei zeitabhängig, wurden vielfach längere Inkubationszeiten vorgeschlagen (STOCKEM, 1969; ARNOLD, 1971; SONNTAG und ARNOLD, 1973), was aber ebenfalls nicht zu dem gewünschten Erfolg führte. Eine andere Möglichkeit besteht darin, das Gewebe so zu behandeln, daß eine bessere Diffusion des Sols ins Blockinnere wahrscheinlich wird. Das Reaktionsergebnis läßt sich jedoch weder durch die Art der Fixierung (STOCKEM, 1969; ARNOLD und HAGER, 1969) noch durch thermoosmotische Behandlung (ARNOLD und HAGER, 1969), Lipidextraktion oder Zugabe von Lösungsvermittlern (ARNOLD, 1971) beeinflussen. Es gelingt immer nur die Darstellung intracytoplasmatischen Materials unmittelbar unter der Objektoberfläche (ARNOLD, 1971; MCCRACKEN und BARCELLONA, 1975) oder an Objekten, die ihrer Natur nach nur sehr kleine Diffusionsstrecken aufweisen: Einzelzellsuspensionen (SWIFT und ADAMS, 1962; GASIC und BERWICK, 1963; DRAGONETTI et al., 1974; - aber auch negative Ergebnisse: BEHNKE, 1967), Suspensionen von Zellorganellen (DOUGHERTY und LEE, 1970), Zellkulturen (YARDLEY und BROWN, 1965). Versuche allerdings, vergleichbare Bedingungen durch Inkubation sehr dünner Gewebescheiben (von größeren Objekten) zu schaffen, führten

nicht zum Ziel (MATUKAS et al., 1967; GEYER und WATZIG, 1969; ARNOLD, 1971). Allein die Methode von WETZEL et al. (1956, 1966), bei der Kryostatschnitte inkubiert, dann eingebettet und für die elektronenoptische Abbildung aufgearbeitet werden,ergibt brauchbare Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei weitere Verfahren zur Überwindung der geschilderten Schwierigkeiten bei der Blockkontrastierung mit dem Eisenoxidhydratsol beschrieben:

1. Die Blockinkubation erfolgt im *Ferrioxidhydratsol*. Durch Zusatz von Schutzkolloiden (MÜLLER, Diskussionsbeitrag zu ARNOLD, 1971) oder kleinmolekularen bipolaren Substanzen sollte eine Koagulation des Kolloids an der Gewebeoberfläche verhindert werden.

   Dazu wurden vorher folgende Eigenschaften des Reagenzes näher untersucht, die möglicherweise das Versuchsergebnis beeinflussen können:

   a) Die Größe der kolloidalen Partikel des verwendeten Sols wurde bestimmt, um zu prüfen, ob ein Durchdringen von Zellmembranen prinzipiell möglich ist.

   b) Da Ferri-Ionen andere Bindungseigenschaften aufweisen als das Oxidhydrat, wurde der Einfluß einer Fe^{+++}-Verunreinigung des Eisenoxidhydratsols auf das Ergebnis der EBR als mögliche Fehlerquelle untersucht.

2. Die Blockinkubation erfolgt nicht im Sol selbst, sondern in der *molekulardispersen Lösung einer Eisenverbindung*, die in Ferrioxidhydrat umgewandelt werden kann:

   - Eisenionen (Ferrichlorid in wäßriger Lösung)
   - Eisenchloridmoleküle (Ferrichlorid in äthanolischer Lösung)

- Eisenkomplexverbindung (wäßrige Ferrirhodanidlösung)

Die anschließende Umwandlung in das Oxidhydrat durch heiße Hydrolyse sollte das Reagenz unmittelbar am potentiellen Bindungsort entstehen lassen. (Verschiebung des Gleichgewichts der endothermen Reaktion durch Temperatursteigerung auf die Seite des Oxidhydrats.)

Die Versuche wurden an der Unterkieferspeicheldrüse der Ratte durchgeführt, deren geringer Sialinsäuregehalt (SPICER und WARREN, 1960; HASHIMOTO et al., 1961; KOFOED et al., 1969; MOSCHERA und PIGMAN, 1975) nur zu einem sehr schwachen Reaktionsausfall bei den meisten Nachweisreaktionen auf saure Gruppen führt (QUINTARELLI und CHAUNCEY, 1960; SPICER, 1960; SEIFERT, 1964; BAKER et al., 1964), während andererseits die EBR aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit kräftig positive Ergebnisse auch an diesem Objekt zeigt (GEYER, 1957; SHACKLEFORD und KLAPPER, 1962; BAKER et al., 1964; VILLA und FAVA DE MOREAS, 1964).

Das färberische und histochemische Verhalten der Gl. submandibularis der Ratte hängt allerdings nicht nur von Geschlecht und Alter (GRAD und LEBLOND, 1949; JACOBI und LESSON, 1969; TUROLLA und MARTINAZZI, 1963; KIM et al., 1970), sondern auch von der vorangegangenen Fixierung ab (HOLLMANN und VERLEY, 1965; CIOFI-LUZZATO et al., 1968; SIMSON, 1977; SIMSON et al., 1973, 1978). Es mußte daher zunächst eine für die vorliegenden Versuche *hinsichtlich des Substrates* geeignete Fixierung gefunden werden.

MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchungen wurden an Gll. submandibulares adulter weiblicher Sprague-Dawley-Ratten (ca. 300 g) durchgeführt. Die Tiere erhielten eine Standarddiät (Altromin^{R}) und Wasser ad libitum.

I. Lichtmikroskopische Untersuchungen

A) Fixierungsabhängigkeit der EBR am Paraffinschnitt:

Die Speicheldrüsen wurden in tiefer Äthernarkose entnommen und Gewebescheiben von max. 2 mm Dicke für 24 h bei 4°C in eine der folgenden Fixierungsflüssigkeiten gebracht:

1. Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 (v/v)
   (FOLCH et al., 1957)

2. Gemisch nach CARNOY (Chloroform/Methanol/Eisessig)
   (ROMEIS, 1968, § 226)

3. Gemisch nach BOUIN (Formol/Eisessig/Pikrinsäure)
   (ROMEIS, 1968, § 304)

4. 4% Formaldehyd in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.2
   (LILLIE, 1954)

5. 4% Glutardialdehyd in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.2
   (SABATINI et al., 1963)

6. 4% Formaldehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer, pH 7.2

7. 4% Glutardialdehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer, pH 7.2

8. 2% Glutardialdehyd + 2% Formaldehyd in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.2 (mod. n. KARNOVSKY, 1967)

9. 2% Glutardialdehyd + 2% Formaldehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer, pH 7.2

10. Um den Einfluß der Kombination von Glutardialdehyd mit Cacodylatpuffer genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich:

    a) bei nicht verändertem Cacodylatpuffer das Verhältnis von Form- und Glutardialdehyd variiert;

    b) bei nicht verändertem Glutardialdehyd das Verhältnis von Phosphat- und Cacodylatpuffer variiert (Tab. 1).

Nach den gepufferten Aldehydfixierungen (4-10) wurde das Gewebe im fixansfreien Puffer, nach (1) in absolutem, nach (2) in 96%-igem, nach (3) in 90%-igem Äthanol gespült, dann über die aufsteigende Alkoholreihe, Benzoesäuremethylester und Benzol in Paraplast eingebettet.

7 µm Schnitte wurden über Xylol und die absteigende Alkoholreihe gewässert und die EBR nach MÜLLER (1955; modifiziert nach GRAUMANN und CLAUSS, 1958) durchgeführt:

10'		5 Teile Eisenoxidhydratsol dialysiert (MOWRY, 1961)
	+	2 Teile Eisessig
2 x 5'		5%-ige Essigsäure
10'		0.67%-iges Kaliumferrocyanid in 0.67%-ige HCL

Anschließend wurden die Schnitte entwässert und in DePeX eingedeckt.

B) Fe^{+++}-Gehalt des Sols - Einfluß auf die EBR am Paraffinschnitt:

Um in Erfahrung zu bringen, in welchem Maße der Fe^{+++}-Gehalt des Sols das Ergebnis der EBR beeinflußt und evtl. stört, wurden verschiedenen Solpräparationen bekannte Mengen Ferri-Ionen zugemischt und diese Medien dann in der EBR nach GRAUMANN und CLAUSS (1958) am Paraffinschnitt getestet. Folgende Lösungen wurden kombiniert:

1. Eisenoxidhydratsol, hergestellt nach KRECKE (1871; modifiziert nach MÜLLER, 1955) aus $FeCl_3 \times 6\ H_2O$ durch Hydrolyse in kochendem Wasser
   a) 6 Wochen alt oder
   b) 6 Wochen alt, unmittelbar vor Gebrauch aufgekocht und sofort nach Abkühlung verwendet (MOWRY, 1961) oder
   c) vor Gebrauch 1 Woche dialysiert (MOWRY, 1961) oder
   d) frisch d.h. unmittelbar nach Herstellung und Abkühlung

und

2. wäßrige 0.5%-ige Eisenchloridlösung aus $FeCl_3 \times 6\ H_2O$

(1) und (2) wurden in den Verhältnissen 10:0, 9:1 usw. bis 1:9 und 0:10 gemischt.

C) Blockinkubation:

1. Gewebeentnahme und Fixierung:

Gewebeblöckchen mit einer Kantenlänge von 0.5 - 1 mm wurden für 2 h bei 4°C in ein wäßriges Fixierungsgemisch gebracht, das 2% Formaldehyd (aus Paraformaldehyd), 2,5% Glutar-

dialdehyd und 7.5% Saccharose in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.2 (KARNOVSKY, 1967) enthielt, anschließend 12 - 18 h im mehrmals gewechselten fixansfreien Puffer gespült.

2. Nachweisreaktionen

a) Blockinkubation in Eisenoxidhydratsol unter Zugabe von Schutzkolloiden oder kleinmolekularen bipolaren Verbindungen:

Nach den Pufferspülungen wurden die Gewebeblöckchen in aqua dest. gebracht, dann für 1 h und 24 h bei Raumtemperatur (RT), 40°, 60° und 80° bzw. für 1 h und 2 1/2 h bei Siedetemperatur in folgenden Medien inkubiert:

5 Teile frisches (s.o.) Eisenoxidhydratsol und 2 Teile

aa) aqua dest.
bb) 7% Dextran 35
cc) 7% Gummi arabicum
dd) Essigsäure
ee) Äthanol
ff) Aceton
gg) 37% Formaldehyd
hh) 25% Glycerin

Kontrollpräparate wurden in eisenfreiem aqua dest. inkubiert.

Anschließend wurde das Gewebe in aqua dest. gespült, über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in EFL (Hydroxyäthylmethacrylat - NEMETSCHEK-GANSLER et al., 1972) eingebettet.

b) Blockinkubation in Ferrirhodanidkomplex:

Um die Entstehung nicht-komplexgebundenen Eisens zu verhindern, wurde dafür Sorge getragen, daß Rhodanidionen immer im Überschuß vorhanden sind. Das Gewebe wurde für

10' in eine 5%-ige wäßrige NH_4SCN-Lösung, dann 1 h in eine Lösung gebracht, die 0,5% Eisenchlorid ($FeCl_3 \times 6\ H_2O$) und 5% Ammoniumrhodanid enthielt. Ein Teil der Blöcke wurde darauf mit aqua dest. oder 5%-iger NH_4SCN-Lösung gespült. Die übrigen wurden für 20' bei 100°C in aqua dest. oder 5%-iger NH_4SCN-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte über die aufsteigende Alkoholreihe die Einbettung in EFL.

c) Blockinkubation in Eisen-(III)-chloridlösungen:

Um evtl. Einflüsse der unterschiedlichen Gewebeblockgröße auszuschließen, wurden für die nachfolgenden Versuche einheitliche Würfel der Kantenlänge 0.8 mm mit dem SORVALL-tissue-sectioner hergestellt. Die Inkubation erfolgte für 1 h in einer wäßrigen 0.5%-igen Eisenchloridlösung ($FeCl_3 \times 6\ H_2O$) oder, nach Entwässerung des Gewebes über die aufsteigende Alkoholreihe, in einer 0.5%-igen Lösung in absolutem Äthanol. Kontrollen wurden in reinem aqua dest. bzw. Äthanol inkubiert. Ein Teil der Blöcke wurde anschließend im jeweiligen eisenfreien Lösungsmittel gespült und über Äthanol in EFL eingebettet. Die übrigen Präparate wurden einer der folgenden Nachbehandlungen unterzogen: Der wäßrigen Lösung folgte eine Inkubation für 20' in aqua dest. von 100°C. Aus der äthanolischen Eisenchloridlösung wurde das Gewebe entweder 1', 2', 5', 10', 20' oder 40' in aqua dest. von 60°C, 80°C oder 100°C gebracht. Danach wurden die Blöcke in aqua dest. von 22°C in großem Überschuß gespült und über die aufsteigende Alkoholreihe in EFL eingebettet.

d) Schnittfärbung an EFL-eingebettetem Material

Mit dem SORVALL-Mikrotom JB-4 wurden Semidünnschnitte (1 µm) senkrecht zur Präparatoberfläche gefertigt und ohne Zusatz auf Objektträger aufgezogen. Da durch die Blockinkubation bereits der erste Schritt der EBR - die

Bindung des Eisens an ein Substrat - vollzogen war, mußte an den Schnitten nur noch die Berliner-Blau-Reaktion zum Nachweis des dreiwertigen Eisens, entsprechend dem zweiten Schritt der EBR, durchgeführt werden. Danach Entwässerung und Eindecken in DePeX.

3. Kontrollreaktionen

Die Kontrollreaktionen wurden am fixierten Gewebeblock durchgeführt. Anschließend wurden die Blöcke mit äthanolischer Eisenchloridlösung und aqua dest. (100°C, 20') behandelt.

a) Methylierung der Carboxylgruppen (TERNER, 1964) 18 h; z.T. mit nachfolgender Verseifung in wäßriger 2%-iger Kaliumhydroxidlösung für 10' (LILLIE, 1958; nach ARNOLD, 1968).

b) Milde saure Hydrolyse (QUINTARELLI et al., 1961; modifiziert nach KLESSEN, 1973): Gewebe für 30', 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h, 18 h, 24 h und 48 h in 0.05 N HCL bei 60°C; Kontrollen in aqua dest.

II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

A) Größenverteilung der Ferrihydroxidpartikel:

Das Sol wurde in der von MÜLLER (1955) angegebenen Modifikation nach KRECKE (1871) hergestellt und in folgenden Präparationen untersucht:

1. Unmittelbar nach der Herstellung
2. Nach einwöchiger Dialyse
3. Unmittelbar nach der Herstellung mit Zusatz eines 2%-igen Schutzkolloides. (Gummi arabicum oder Dextran 35)

Auf diese Lösungen wurden befilmte Kupfernetze aufgelegt (BRADLEY, 1956), die nach dem Trocknen im PHILIPS-Elektronenmikroskop EM 300 bei 80 oder 100 kV und den Vergrößerungsstufen 1:159.000 und 1:319.200 photographiert wurden. An vierfach nachvergrößerten Positiven wurde die Partikelgröße ausgemessen.

B) Untersuchungen an der Gl. submandibularis der Ratte:

Gewebeentnahme und Fixierung (Formaldehyd/Glutardialdehyd in Phosphatpuffer - KARNOVSKY, 1967 -) erfolgten wie für die EFL-Einbettung. Die Blöcke wurden entweder in einer wäßrigen oder - nach der aufsteigenden Alkoholreihe - in einer äthanolischen Eisenchloridlösung (0.5% $FeCl_3 \times 6\ H_2O$) eine Stunde inkubiert; für die Kontrollen erfolgte die Inkubation in aqua dest. oder Äthanol. Aus dem wäßrigen Medium wurden die Gewebestücke 20' in aqua dest. von 22°C oder 100°C, aus dem äthanolischen in Äthanol von 22°C oder aqua dest von 100°C gebracht.

Dieser letzten Kontrastierungsvariante (äthan. $FeCl_3$, aqua dest. 20' 100°C) wurden zusätzlich Kontrollreaktionen (Methylierung 18 h, z.T. mit anschließender Verseifung; milde saure Hydrolyse 18 h, Kontrolle in aqua dest) vorausgeschickt.

Die Einbettung erfolgt nach Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe und Propylenoxid in Epon-Araldit. Darauf wurden zunächst Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie angefertigt und die Berliner-Blau-Reaktion durchgeführt. Anhand dieser Übersichtspräparate wurde die Anschnittfläche eines jeden Blockes durch gezieltes Trimmen auf einen Bereich mit lichtmikroskopisch positivem Reaktionsausfall verkleinert.

Ultradünnschnitte wurden mit dem REICHERT-Mikrotom Om U2 hergestellt, auf unbefilmte engmaschige Kupfernetze aufgezogen und im PHILIPS-Elektronenmikroskop EM 300 bei 40 kV beurteilt und photographiert.

BEFUNDE

Die Zellen der Drüsenendstücke werden im folgenden Azinuszellen (AZ), die der Sekretgranula enthaltenden Streifenstücke Sezernierende-Streifenstück-Zellen (SSZ) (BOERNER-PATZELT, 1956) genannt, entsprechend den Bezeichnungen "acinus" und "granular tubulus" oder "granular ducts" im angloamerikanischen Schrifttum (YOUNG u. VAN LENNEP, 1978).

A) Einfluß der Fixierung auf die EBR am Paraffinschnitt:

Die konventionelle EBR an entparaffinierten Gewebeschnitten zeigt eine starke Abhängigkeit des Ergebnisses von der Art der Fixierung: Nach Fixierung mit Chloroform/Methanol oder Carnoyscher Flüssigkeit ist der Reaktionsausfall äußerst schwach im Bereich der AZ; in den SSZ findet sich lediglich basal etwas körniges blaugefärbtes Material. Nach Fixierung mit dem Gemisch nach Bouin sind die apikalen Bereiche der AZ kräftig blau gefärbt, alle übrigen Strukturen bleiben aber völlig ungefärbt.

Nach den unterschiedlich abgepufferten Aldehydfixierungen ist die Reaktion in den AZ immer dann positiv, wenn die jeweiligen Fixierungsgemische *nicht* Glutardialdehyd und Cacodylat *gemeinsam* enthalten. Nach Fixierung in Glutardialdehyd/Cacodylatpuffer bzw. Glutardialdehyd + Formaldehyd/Cacodylatpuffer sind die AZ sehr ungleichmäßig angefärbt, z.T. blasig strukturiert, z.T. fast negativ, insgesamt aber vor allem viel schwächer positiv als nach anderen Aldehyd-Puffer-Kombinationen.

Wenn Glutardialdehyd mit Gemischen von Phosphat- und Cacodylatpuffer verwendet wird, ist das Ergebnis gegenüber einer Glutardialdehyd/Cacodylatpuffer-Fixierung nur wenig verbessert; es zeigt sich aber je nach Phosphatpufferanteil ein mehr oder minder schmaler Randsaum mit intensiver EBR-positiv reagierendem Material in den AZ.

Bei variierten Mischungsanteilen von Form- und Glutardialdehyd in Cacodylatpuffer ist der Unterschied im Reaktionsergebnis zwischen Schnittrand und -zentrum groß: Je mehr Formol die Fixierungsflüssigkeit enthält, desto breiter ist der Saum, in dem man eine gute Anfärbung des Zytoplasmas der AZ mit der EBR erhält; allerdings fällt die Reaktion auch hier schwächer aus als etwa nach Formol/Cacodylatpuffer.

Als unabhängig von der vorangegangenen Fixierung erweist sich die Anfärbbarkeit der im interstitiellen Gewebe vorhandenen Mastzellen, deren Granula in jedem Falle intensiv EBR-positiv reagieren.

B) Einfluß des Fe^{+++}-Gehaltes des Ferrioxidhydratsols auf das Ergebnis der EBR am Paraffinschnitt:

Nach Durchführung der EBR mit dem Sol ohne Ferri-Ionenzusatz reagieren das Zytoplasma der AZ kräftig positiv, alle anderen Gewebeanteile in Abhängigkeit von der Präparation des Sols (s.u.) äußerst schwach oder völlig negativ. Bei Verwendung einer wäßrigen Eisenchloridlösung ohne Eisenoxidhydratzusatz zeigt sich ein völlig anderes Ergebnis: Es werden nur die Zellkerne und schwächer auch die Mastzellgranula dargestellt, während alle übrigen Strukturen - insbesondere das Zytoplasma der AZ - ungefärbt bleiben. Die Färbung ist insgesamt wesentlich weniger intensiv als bei der üblichen EBR.

Mit Mischungen aus beiden Lösungen erhält man schon bei 20% Sol in wäßrigem Eisenchlorid eine deutliche Anfärbung des Zytoplasmas der AZ, die dann bei 40-50% schon so kräftig ist, daß die schwache Ferri-Ionen-bedingte Reaktion an den Kernen die EBR kaum noch stört.

Allerdings ist bei allen Mischungen eine geringe Anfärbung der Kerne zu beobachten, oft sogar, wenn auch äußerst schwach, noch bei Inkubation ohne Eisenchloridzusatz, also im Sol allein. Beim Vergleich der verschiedenen Eisenoxidhydratpräparationen ist die Kernreaktion bei Verwendung eines älteren Sols am ausgeprägtesten, nach Aufkochen resp. Verwendung eines frischen Ansatzes nur sehr gering. Nur die Inkubation in einem dialysierten Sol unmittelbar nach dessen Entnahme aus dem Dialyseschlauch führt zu einem völligen Ausbleiben der Reaktion von Kernen.

C) Versuche zur Blockinkubation

1) Zugabe von Schutzkolloiden oder kleinmolekularen bipolaren Verbindungen zum Ferrioxidhydratsol:

Nach Inkubation von kleinen Gewebestücken bei Raumtemperatur im zusatzfreien Eisenoxidhydratsol findet sich ein wechselnd breiter Saum von koagulierten kolloidalen Teilchen auf der Blockoberfläche - also *außerhalb des Gewebes* - zusätzlich in einem schmalen Bereich unmittelbar darunter - also *im Gewebe selbst* - eine zarte Anfärbung der Kerne und teilweise des basalen Zytoplasmas der AZ. Letztere nimmt mit steigender Inkubationstemperatur deutlich ab, um bei 80°C und Siedetemperatur völlig zu verschwinden, während das Ausmaß der Eisen-"Auflagerung" gleich bleibt.

Der Zusatz von Dextran bzw. Gummi arabicum als Schutzkolloid verhindert die starke Koagulation kolloidaler Teilchen auf der Blockoberfläche. Statt dessen liegt nur ein feiner Saum von Reaktionsprodukt dem Block auf. Hinsichtlich der Eisenverteilung innerhalb des Gewebes findet man das gleiche Verhalten wie ohne Schutzkolloid.

Der Zusatz von Essigsäure, Äthanol, Aceton etc. verringert ebenfalls die Präzipitation auf der Blockoberfläche, aber mit geringerem Erfolg. Bei niedriger Inkubationstemperatur sieht man wie bei der Inkubation mit dem reinen Sol schwach angefärbte Kerne und Zytoplasmaanteile; bei erhöhter Temperatur scheint vergleichsweise mehr Eisen ins Gewebe zu gelangen, allerdings nur in einem sehr schmalen Randbereich. Außerdem ist die Verteilung des Reaktionsproduktes in den penetrierten Zellen meist sehr diffus und zeigt kaum eine Differenzierung bezüglich intrazellulärer Strukturen.

2) Inkubation in molekulardispersen Lösungen von Eisen und Umwandlung in das Ferrioxidhydrat am Substratort:

a) Ferrirhodanidkomplex als Vorläufer:

Nach Inkubation von Gewebeblöcken in Eisenrhodanidlösung zeigt sich nach Berliner-Blau-Reaktion am Semidünnschnitt unabhängig von der Blocknachbehandlung eine Anfärbung von Kernen und Zytoplasma der AZ unter Aussparung der Granula.

b) Fe^{+++}-Ionen bzw. $FeCl_3$-Moleküle als Vorläufer:

Sowohl wäßrige als auch äthanolische Eisenchloridlösungen dringen gut in fixierte Gewebsblöcke ein. Ähnlich wie nach einer EBR mit Eisenchlorid am Paraffinschnitt sind nach Blockinkubation im wäßrigen Medium die Kerne deutlich dargestellt, die Tingierung des Zytoplasmas der AZ ist schwach, die Sekretgranula bleiben ausgespart (Abb. 1 a). Eine nachfolgende Behandlung des Blockes mit aqua dest. bei 100° C führt zu einer unterschiedlich starken Abschwächung der Kern- und Zytoplasmafärbung, während die Menge des Reaktionsproduktes an den Granula zunimmt. Allerdings gilt dies nur für vereinzelte, in der äußersten Blockperipherie lokalisierte Azini, während der Rest schwach bis negativ reagiert (Abb. 1 b).

Nach Blockinkubation in äthanolischer $FeCl_3$-Lösung sind Kerne und Zytoplasma der AZ kräftiger angefärbt als bei Verwendung einer wäßrigen Lösung; die Sekretgranula reagieren ebenfalls völlig EBR-negativ. Zusätzlich erfolgt eine schwache Anfärbung des Zytoplasmas der SSZ, einschließlich ihrer Granula (Abb. 1 c). Bei Nachbehandlung mit aqua dest. zeigen Temperaturerhöhung und Verlängerung der Inkubationszeit einen gleichartigen Effekt: Kurze Zeiten bzw. niedrige Temperaturen üben nur eine geringe Wirkung auf das Reaktionsergebnis aus; die Anfärbung der Kerne und der Granula der SSZ wird schwächer. Eine Darstellung der Granula der AZ ist bei 60° C erst nach 40', bei 100° C schon ab 1' bis 2' zu erkennen. Eine kräftige und in einem größeren Bereich einheitliche Reaktion an den Sekretgranula der AZ beobachtet man nach einer Inkubation von 20' bei 100° C (Abb. 1 d). Eine längere Inkubation führt zu einer Abschwächung der EBR.

An dem als Kontrolle in einer eisenfreien Lösung inkubierten Gewebe fällt die Berliner-Blau-Reaktion negativ aus.

3) Kontrollreaktionen:

a) milde saure Hydrolyse

Bis zu einer Hydrolysedauer von 7 h ist kein Effekt auf das Ergebnis der anschließend durchgeführten Nachweisreaktion (1 h äthan. FeCl-Lösung, 20' aqua dest. 100° C) zu beobachten. Nach einer Inkubationszeit von 18 h und länger lassen sich keine Granula der AZ mehr darstellen; allerdings besteht kein Unterschied zu Gewebeblöckchen, die (zur Kontrolle) gleich lang mit aqua dest. behandelt wurden.

b) Methylierung

Nach vorangegangener Methylierung lassen sich mit Ausnahme einer schwachen und mehr diffusen Anfärbung in einem schmalen Randsaum keine EBR-positiven Strukturen mehr darstellen. Durch Verseifung im Anschluß an die Blockierung wird die Anfärbbarkeit der Sekretgranula wiederhergestellt; gegenüber nicht vorbehandelten Präparaten sind zusätzlich alle übrigen Zell- und Organanteile stärker tingiert.

D) Elektronenmikroskopische Befunde:

1) Größenverteilung der Ferrioxidhydratpartikel:

Die kolloidalen Teilchen liegen in "cluster"-artigen Aggregationen dicht beieinander, so daß die Identifizierung von einzelnen Partikeln oft schwierig ist. Die räumliche Auflösung läßt sich zum einen durch starke Verdünnung (1:10 bis 1:20), zum anderen durch Zugabe von Schutzkolloiden verbessern.

Bei Annahme von sphärischen Partikeln und Vorliegen einer Normalverteilung wurden folgende Mittelwerte bei den verschiedenen Ansätzen erhalten:

im frischen Sol	4.5	nm	±	2	nm
nach Dialyse	6	nm	±	2.5	nm
unter Zusatz von Schutzkolloiden	3	nm	±	1	nm

2) Blockkontrastierung an der Gl. submandibularis der Ratte:

Ultradünnschnitte von Präparaten, die im eisenfreien Lösungsmittel inkubiert worden sind, zeigen in der elektronenoptischen Abbildung keinen Kontrast.

Die Kontrastierung mit einer wäßrigen Eisenchloridlösung führt zu einem sehr kontrastarmen Bild. Etwas kräftiger dargestellt sind das Chromatin, die Granula der SSZ und die Lamellen des rauhen endoplasmatischen Retikulums. Besonders kontrastarm sind die Granula der AZ, die nur eine sehr schwache, leicht wolkige Binnenstruktur zeigen (Abb. 2 a).

Wird nach Inkubation in wäßriger Lösung der Gewebeblock noch mit aqua dest. von 100°C behandelt, so erhöht dies den Kontrast stark. Im Vergleich zum zuvor beschriebenen Präparat wirkt die Chromatinstruktur plumper, das Lamellensystem des endoplasmatischen Retikulums gröber. Die Granula der SSZ sind kräftig dargestellt, heben sich aber kaum von der ebenfalls kontrastierten Umgebung ab. Die Granula der AZ zeigen auf einem sehr hellen Untergrund eine kontrastreiche, filamentös-granuläre Binnenstruktur, durchsetzt von fleckförmigen, eher amorphen Bezirken (Abb. 2 b).

Nach Inkubation in äthanolischer Lösung und anschließender Behandlung mit kochendem aqua dest. erhält man ein ähnliches Bild. Verglichen mit den in wäßriger Lösung inkubierten Präparaten ist der Kontrast der Kerne und des endoplasmatischen Retikulums weniger intensiv und etwas aufgelockerter. Die Granula der AZ sind gleichmäßiger und feiner filamentös ohne Granulierung dargestellt, mit einer insgesamt netzartigen Binnenstruktur (Abb. 2 c).

Die Kontrollreaktionen werden am fixierten Gewebeblock vor der Inkubation in äthanolischer $FeCl_3$-Lösung und anschließender Behandlung mit aqua dest. von 100°C durchgeführt. Sowohl nach einer milden sauren Hydrolyse von 18 h als auch im aqua dest.-behandelten Präparat finden sich eine allgemeine Abnahme des Kontrastes, insbesondere auch an den Granula der AZ. Die Methylierung führt ebenfalls zu einer ausgeprägten Abschwächung des Kontrastes. Im Unterschied zum Bild nach Hydrolyse zeigt sich aber ein völliges Verschwinden der Binnenstruktur der Granula der AZ. Eine anschließende Verseifung steigert zwar wieder den

allgemeinen Kontrast, jedoch ist die Differenzierung der Strukturen gegenüber regulär inkubierten Präparaten stark herabgesetzt. Die Granula der AZ sind zwar kontrastreicher als nach ausschließlicher Methylierung, jedoch mehr diffus und ohne Ausbildung einer filamentösen Binnenstruktur.

DISKUSSION

A) Physikochemie von Substrat und Reagenz:

Das Problem des Eindringens kolloidaler Teilchen in Blöcke fixierten Gewebes wird kompliziert durch spezielle Eigenheiten der in dieser Untersuchung ausgewählten Reaktionspartner. Die Vorversuche dienten dazu, die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Durchführung der eigentlichen Experimente zur Blockinkubation abzuklären.

1. Fixierungsabhängigkeit der EBR an der Gl. submandibularis der Ratte:

Die Darstellbarkeit der Granula von AZ mit der EBR hängt stark von der vorangegangenen Fixierung ab. Die eigenen Ergebnisse stehen in Einklang mit den Befunden, die SIMSON (1977) mit der PAS-Reaktion nach fettlösenden Fixierungen an der Submandibularis erhalten hat; nicht bestätigt werden kann das von ihm beschriebene negative Reaktionsergebnis nach Fixierung in Bouin'schem Gemisch, das auch VILLA und FAVA DE MOREAS (1964) nicht fanden.

Bei Aldehydfixierungen zeigt sich ein Einfluß der verwendeten Puffer auf die Ultrastruktur der Granula der AZ (SIMSON, 1977; SIMSON et al., 1978). Daneben konnte in den vorliegenden Versuchen eine Auswirkung auf das zytochemische Verhalten gegenüber der EBR aufgezeigt werden: Eine Kombination von Glutardialdehyd und Cacodylatpuffer im Fixierungsgemisch verhindert offensichtlich eine positive EBR.

Zur Erklärung dieses Befundes sind zwei Möglichkeiten (im wesentlichen) denkbar:

1. Das Substrat geht für den histochemischen Nachweis durch Lösung im Fixans oder - nach unzureichender Fixierung - während der nachfolgenden Entwässerungs- und Einbettungsprozedur verloren.

2. Durch Reaktion mit Bestandteilen des Fixans werden entweder EBR-reagible Gruppen blockiert oder, umgekehrt, erst gebildet.

Für die Annahme einer Herauslösung des Substrates spricht bei den fettlösenden Fixierungen, daß sowohl die PAS-Reaktion als auch die EBR beeinflußt werden, also Nachweisreaktionen, die sich auf verschiedene funktionelle Gruppen des Kohlenhydrates beziehen. Andererseits muß den Fixierungseffekten kein einheitlicher Mechanismus zugrundeliegen. Insbesondere weist die Diskrepanz zwischen PAS-Reaktion und EBR nach Bouin'scher Fixierung darauf hin. Da über die stoffliche Natur der Granula der AZ keine Einigkeit besteht (Tab. 2+3),kann dieser Punkt nicht geklärt, sondern muß weiter untersucht werden.

Neben sialinsäurehaltigen Glykoproteinen wurden auch Mono- bzw. Disialoganglioside und Mono- bzw. Dihexosesulfatide, die prinzipiell ebenfalls mit der EBR dargestellt werden können (ADAMS und BAYLISS, 1968) in der Submandibularis nachgewiesen. Es sind jedoch wesentlich mehr saure Gruppen an Protein als an Lipid gebunden (Tab. 3). Dies macht es unwahrscheinlich, daß durch Lipidextraktion der überwiegende Teil der Reagibilität verlorengeht. Eine eindeutige Zuordnung der im Zellhomogenat nachgewiesenen Substanztypen zu den Granula der AZ oder denen der SSZ ist nicht möglich, da die Anfärbbarkeit beider Strukturen gegenüber Fixierung in lipidlösenden Medien empfindlich ist (SIMSON, 1977; SIMSON et al., 1973).

Für das weitere Vorgehen ist damit aber geklärt, welche Fixierungen notwendige Voraussetzung für die Durchführung der EBR sind: Geeignet sind alle geprüften reinen Formolfixierungen, von den Fixierungen, die Glutardialdehyd enthalten, aber nur diejenigen mit Phosphatpuffer.

2. Zusammensetzung des Sols hinsichtlich Teilchengröße und Fe^{+++}-Gehalt:

Obwohl Ferri-Ionen an anderen Strukturen gebunden werden als kolloidale Ferrioxidhydratteilchen (ARNOLD, 1971), ändert sich an der EBR am Paraffinschnitt wenig, wenn man Fe^{+++}-Ionen - auch in einem größeren Anteil - dem Sol zumischt. Als Grund hierfür mögen die sehr großen Intensitätsunterschiede zwischen den Ergebnissen der Berliner-Blau-Reaktion an diesen Eisenmodifikationen gelten: Die zwar immer vorhandene, jedoch vergleichsweise sehr schwache, auf Fe^{+++}-Ionen zurückzuführende Anfärbung tritt in den Hintergrund gegenüber den viel kräftiger dargestellten EBR-positiven Gewebsstrukturen und wirkt dadurch fast negativ. Dagegen bleibt der Ausfall der EBR auch nach Verdünnung sehr intensiv (MOWRY, 1963 b).

Bei Abnahme des Fe^{+++}-Anteils im Sol nimmt auch die für die EBR unspezifische Kernfärbung ab. Ein völliges Verschwinden der Kerndarstellung wird entsprechend den Empfehlungen von MOWRY (1961, 1963 a) nur mit frisch dialysiertem Sol erreicht. Auch ohne absichtlichen Zusatz besitzt das Sol einen gewissen Fe^{+++}-Gehalt (HEYMANN, 1928), da die bei hohen Temperaturen vollständige Hydrolyse beim Abkühlen bis zu einem temperaturabhängigen Gleichgewicht zugunsten einer Zunahme der Fe^{+++}-Konzentration zurückgeht. Diesem Befund lassen sich die schon nach wenigen Tagen eingetretene Veränderung der Absorptionseigenschaften des Sols (ARNOLD und KLESSEN, 1975) und das Auftreten schnell und weit wandernder Substanzen neben der auf das Oxidhydrat zurückzuführenden Bande im Filtrierpapierstreifentest (MÜLLER, 1964) zuordnen.

Insbesondere bei der Blockinkubation muß ein Fe^{+++}-freies Sol verwendet werden, da wegen der guten Penetrationsfähigkeit der Ferri-Ionen (WETZEL et al., 1966; ARNOLD u. HAGER, 1969) - im Vergleich zu kolloidalen Partikeln - schon bei geringer Verunreinigung nicht mehr eindeutig ausgeschlossen werden kann, daß eine Anfärbung mit Fe^{+++} stattgefunden hat. Die Erfolge nach sehr langer Blockinkubation im Sol (z.B. CANTIN und

BENCHIMOL, 1975) dürften durch Ferri-Ionen vorgetäuscht werden, die durch Umkehrung der Hydrolyse entstanden sind.

Zusammenfassend kann folgendes gelten: Für die meisten Untersuchungen dürfte die Verwendung des nicht-dialysierten Sols hinreichend und die Angabe einer monatelangen Haltbarkeit des Sols (MÜLLER, 1955; GRAUMANN und CLAUSS, 1958) zutreffend sein. Bei speziellen Fragestellungen kann jedoch eine Fe^{+++}-Beimischung Bedeutung erlangen, und dann erscheint eine Dialyse, die molekulardisperses Eisen entfernt (ARNOLD, 1971), oder eine Erhöhung der Temperatur während der Inkubation gemäß den Ergebnissen von HEYMANN (1928) angebracht.

Das Ferrioxidhydratsol erweist sich als polydispers, wobei die Ergebnisse der Größenbestimmung seiner Partikel im wesentlichen denen früherer Messungen entsprechen (Tab. 4). Die untere Grenze liegt nahe der für ein kolloidales Teilchen aus theoretischen Überlegungen angegebenen Minimalgröße (SONNTAG, 1977). Allerdings ist die angewandte Meßmethode mit erheblichen Fehlerquellen behaftet:

1. Die notwendige Vergrößerung liegt an der Grenze des elektronenmikroskopischen Auflösungsvermögens, die das Identifizieren eines Objektes noch erlaubt, jedoch ein Ausmessen sehr erschwert (BATEL, 1971).

2. Die Präparationsmethode greift erheblich in das kolloidale System ein. Beim Trocknen kommt es durch Zunahme der Teilchenkonzentration zu einer Flockung (BATEL, 1971; SONNTAG, 1977), so daß mit einer Vergröberung der Partikel gerechnet werden muß.

Durch Schutzkolloidzugabe läßt sich eine bessere Trennung der Einzelteilchen erreichen. An die Oberfläche eines hydrophoben Partikels adsorbiert setzen sie nämlich zum einen die Koagulabilität stark herab (FREUNDLICH, 1932) und verhindern zum anderen

auch bei eingetretener Flockung eine Koaleszenz, d.h. ein Verschmelzen der Teilchen miteinander (SONNTAG, 1977), so daß das einzelne erkennbar bleibt. Dies erklärt, daß nach Schutzkolloidzusatz mehr kleine Teilchen gefunden werden als im reinen Sol. Die Dialyse scheint umgekehrt eine Verminderung der kleinsten Teilchen zu bewirken. Entweder gehen also neben Fe^{+++}-Ionen (ARNOLD, 1971) auch noch kolloidale Teilchen durch die Dialysemembran verloren, oder aber die besonders ausgeprägte Labilität eines elektrolytfreien Sols (EDELMANN, 1962) führt in ausgeprägterem Maße zu dem Artefakt einer Teilchenvergröberung bei der Präparation.

Ausgehend von der Modellvorstellung des Plasmalemms als einer Dialysemembran abgestufter Porenweite, deren Größenbereich teilweise dem an den kolloidalen Partikeln gemessenen entspricht (NETTER, 1959), erscheint eine Penetration in das Zellinnere zumindest der kleinsten Teilchen möglich.

B) Anpassung der EBR an die Bedingungen der Blockinkubation

Aus den lichtmikroskopischen Befunden geht hervor, daß:

1. es möglich ist, durch Inkubation eines Gewebeblockes in einer Eisenlösung mit anschließender Berliner-Blau-Reaktion am Schnitt ein Ergebnis zu erhalten, das dem der konventionellen EBR am Paraffinschnitt entspricht;

2. diese Anfärbbarkeit auf das Vorliegen saurer Gruppen im Gewebe zurückzuführen ist.

Elektronenmikroskopisch sieht man ein gleichsinniges Verhalten des Materials in den Granula der AZ; die Kontrastierung des Untergrundes ist jedoch so intensiv, daß zur Identifizierung der eigentlich EBR-positiven Strukturen die gleichzeitige Durchführung von Kontrollreaktionen nötig ist.

Dieses Ergebnis ist nur nach Durchführung einer bestimmten Kombination von Reaktionsschritten erreichbar:

1. In kolloidaler Form dringt Eisen nicht ein; es muß als $FeCl_3$ und zwar in äthanolischer Lösung ins Gewebe eingeführt werden.

2. Das ins Gewebe eingeführte Eisen kann als Ausgangssubstanz für die Herstellung des eigentlichen Reagenzes vor Ort verwendet werden. Diese Reaktion ist von Temperatur und Zeit abhängig.

Der Zusatz geeigneter Substanzen zum Sol verhindert die Koagulation der kolloidalen Teilchen an der Gewebeoberfläche und ermöglicht damit ein Eindringen. Obgleich sowohl das Ergebnis der Größenverteilungsbestimmung des Sols als auch die herabgesetzte Koagulabilität durch Schutzkolloidzusatz (FREUNDLICH, 1932; EDELMANN, 1963; SONNTAG und STRENGE, 1970; SONNTAG, 1977) die Bedingungen für das Eindringen der kolloidalen Partikel durchaus günstig erscheinen lassen, kann aber keine zufriedenstellende intrazytoplasmatische Anfärbung erreicht werden. Die Darstellung von Kernen nach Inkubation bei niedrigen Temperaturen läßt sich vielmehr auf das Eindringen von Fe^{+++}-Ionen, die Bestandteil der üblichen kolloidalen Reaktionslösung sind (s.o.), zurückführen; und sie tritt nicht auf, wenn während der Inkubationszeit das Hydrolysegleichgewicht ganz auf Seiten des Oxidhydrats liegt, also bei höherer Temperatur. Eine Erklärung für den Mißerfolg könnte darin liegen, daß die echten Schutzkolloide aufgrund ihrer eigenen Größe schlecht, zumindest wenn sie an die Oberfläche von Eisenoxidhydratpartikeln adsorbiert sind, in Gewebeblöcke eindringen können.

Ihre günstige Wirkung beschränkt sich somit darauf, eine weitere Aggregation von kolloidalen Partikeln aus der Lösung an bereits an der Blockoberfläche gebundene zu unterdrücken. Durch kleinmolekulare bipolare Verbindungen scheint die Stabilisierung nicht auszureichen, obwohl auch diese Substanzen geeignet sind, den

direkten Kontakt zwischen Partikeln zu verhindern (OVERBEEK, 1966).

Das Plasmalemm kann keine völlig unüberwindliche Barriere für das Eindringen des Sols sein; dies zeigen gute Ergebnisse an geeigneten Objekten, z.B. Zellsuspensionen. Trotzdem führt die Verwendung von Schutzkolloiden nicht zu dem gewünschten Erfolg. Um nicht auf die Penetration kolloidaler Partikel durch die Zellmembran angewiesen zu sein, wurde versucht, zunächst das Eisen in geeigneter Form in das Gewebe einzuführen und dann am Reaktionsort durch Hydrolyse das Ferrioxidhydrat herzustellen. Das Eindringvermögen von Eisenchlorid ist dabei in verschiedenen Lösungsmitteln zwar etwa gleich gut, jedoch hängt das Ergebnis der Nachbehandlung wesentlich von dem zur Lösung verwendeten Medium ab.

Im wäßrigen Milieu kommt es zu einer Bindung des Eisens als Ferri-Ion, somit in einer für die EBR unspezifischen Verteilung, die durch eine anschließend durchgeführte Hydrolyse nur unvollständig geändert wird. Nach diesem Verfahren erhält man nur in einem schmalen Bereich unter der Blockoberfläche eine der herkömmlichen EBR entsprechende Reaktion, die zudem recht variabel in der Intensität ist. Wenn auch die präparative Möglichkeit gegeben ist, Ultradünnschnitte gezielt nur aus diesem Gebiet zu gewinnen, so bedeutet dies doch eine Beschränkung der Untersuchungs- und Aussagemöglichkeiten auf Strukturen, die zufällig in der Nähe der Blockoberfläche gelegen sind. Man benötigt also Bedingungen, unter denen eine feste Bindung des Eisens erst in seiner Modifikation als Oxidhydrat erwartet werden kann.

Die Inkubation zur "Einführung" der Eisenatome muß vielmehr in Äthanol oder einem anderen Lösemittel niedriger Dielektrizitätskonstante (HÜLSER, in Druck), also nicht in Wasser erfolgen, da in einem wenig polaren Medium das Eisenchlorid kaum dis-

soziiert ist (NERNST und THOMSON, 1893, zit. n. ULICH und JOST, 1966), vor allem aber dann die Carboxylgruppen als potentielle Elektrolyte unter diesen Bedingungen nicht ionisiert sind (BARTHEL, 1968, 1976).

Da die Reaktion der Ferri-Ionen zum Oxidhydrat jedoch als Hydrolyse verläuft, ist Wasser als Reaktionspartner erforderlich. Nach Einbringen des Gewebes aus dem äthanolischen ins wäßrige Medium tritt eine Dissoziierung der vorher nicht ionisierten Verbindungen ein, die die oben dargestellte unerwünschte Bindung der Fe^{+++}-Ionen ermöglicht; deshalb muß die Hydrolyse unmittelbar mit dem Zutritt von Wasser vonstatten gehen. Zudem ist das Reaktionsgleichgewicht der Hydrolyse von Eisenschlorid temperaturabhängig; bei 80° (und mehr) liegt es ganz auf Seiten des Oxidhydrates (HEYMANN, 1928). Sowohl aus der Forderung nach einer möglichst hohen Reaktionsgeschwindigkeit als auch aus der nach einer möglichst hohen Umsatzrate ergibt sich somit die Notwendigkeit der hohen Temperatur für die Durchführung der Hydrolyse der Fe^{+++}-Ionen am Block.

Die Durchführung der EBR am Gewebeblock macht sie für die Lichtwie für die Elektronenmikroskopie (unter Verzicht auf die Berliner-Blau-Reaktion bei letzterer) gleichermaßen geeignet. Beim Vergleich der licht- und elektronenoptischen Ergebnisse fällt aber auf, daß entgegen den Erwartungen große Unterschiede bestehen: Das lichtmikroskopische Präparat weist ein Reaktionsbild auf, das dem der herkömmlichen EBR fast völlig entspricht. Zytoplasmabereiche, die im Lichtmikroskop praktisch keine Anfärbung zeigen, stellen sich aber im Elektronenmikroskop sehr kontrastreich dar, während die eigentlichen EBR-positiven Granula der AZ eher hell erscheinen. Dieser Gegensatz kann nicht allein durch die verschiedene Bildentstehung oder Vergrößerung erklärt werden, da z.B. in beiden Verfahren gut differenzierbare Zellbestandteile wie die Granula der SSZ solch ein widersprüchliches Verhalten zeigen. Die Ursache kann nur in der unterschiedlichen Grundlage des "Eisennachweises" gesehen werden: Im EM

geschieht dies über den Kontrast bei Vermeidung jeglicher weiterer Schwermetallkontakte während der Präparation, gleichgültig, in welcher Bindung das Eisen vorliegt. Im LM erfolgt hingegen der Nachweis über Berliner-Blau, das nur mit Eisen eines bestimmten chemischen Zustandes gebildet wird. Anders als bei der herkömmlichen EBR - die nur Ferrioxidhydratpartikel an das Gewebe heranträgt - muß bei der modifizierten Methode zusätzlich in Betracht gezogen werden, daß unter den Bedingungen der hohen Temperatur und einer relativ langen Inkubationszeit auch "Nebenreaktionen" möglich sind, insbesondere die Ausbildung von organischen Eisenverbindungen, z.B. durch kovalente Bindung an eine proteingebundene Gruppe.

Diese Befunde weisen darauf hin, daß eine Parallelität zwischen Ergebnissen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene in idealer Ausprägung nur dann zu erwarten sind, wenn auch im Lichtmikroskop alle im Präparat vorhandenen Schwermetallatome sichtbar werden und die Lichtabsorption proportional ihrer lokalen Menge ist. Ohne Nachbehandlung beschränkt sich der äußerst schwache Kontrast im EM im wesentlichen auf DNA- und RNA-haltige Strukturen. Er wird nach Inkubation sowohl in wäßriger (nur in einem schmalen Bereich) als auch in äthanolischer Eisenchloridlösung durch eine anschließende Hydrolyse generell erheblich verstärkt; darüberhinaus zeigt sich eine Binnenstrukturierung der Granula der AZ. Da diese netzartige Kontrastierung unter den gleichen Bedingungen wie die Anfärbung der Granula im lichtmikroskopischen Präparat auftritt, liegt es nahe, sie als elektronenmikroskopisches Äquivalent des EBR-positiven Materials anzusehen.

Diese Annahme könnte vom Ergebnis der Kontrollreaktionen gestützt werden. Der Neuraminidasetest erscheint ungeeignet, da er zum einen schon an Paraffinschnitt der Gl. submandibularis der Ratte nicht anwendbar ist (SPICER und WARREN, 1960; WARREN und SPICER, 1961; SPICER und DUVENCI, 1964; TOCK und PEARSE,

1965), zum anderen das großmolekulare Enzym wahrscheinlich nur schlecht in Gewebeblöcke eindringt. Problematisch ist auch der Versuch einer Sialinsäureabspaltung durch milde saure Hydrolyse. Dieses als selektiv angesehene Verfahren (TUPPY und GOTTSCHALK, 1972) führt an der Unterkieferspeicheldrüse in biochemischen Untersuchungen nicht zu einer Abspaltung von Sialinsäure (DRAUS, 1964), am histologischen Präparat erst nach sehr langer Hydrolyse wie auch von TOCK und PEARSE (1963) beschrieben, zu einem Verschwinden der Anfärbbarkeit, was allerdings auch in der Kontrolle zu verzeichnen ist. Somit ist der Schluß auf das Vorliegen gebundener Sialinsäuren unzulässig. Das negative Reaktionsergebnis nach Methylierung in Verbindung mit dem positiven Ausfall bei nachfolgender Verseifung spricht für das Vorliegen saurer Gruppen. Allerdings scheint diese Behandlung entweder zu einer Beeinflussung der Struktur oder einer gewissen Verlagerung der nachzuweisenden Substanzen zu führen; das Reaktionsprodukt ist unregelmäßiger verteilt, was auch bei Versuchen mit der konventionellen EBR am Paraffinschnitt beschrieben wurde (BAKER et al., 1964).

Eine Binnenstrukturierung der Granula der AZ, wie sie mit der modifizierten EBR dargestellt wird, wurde bei Verwendung unterschiedlicher Kontrastierungsmethoden gefunden (LESSON und JACOBY, 1959; SCOTT und PEASE, 1959; KURTZ, 1964; HOLLMANN und VERLEY, 1965; TAMARIN und SREEBNY, 1965; CIOFI LUZZATO et al., 1968; RADLEY, 1969; BOGART, 1970, 1975; DOREY und BHOOLA, 1972; MARTINEZ et al., 1975). Sie wird im wesentlichen als fein- und kurz-fibrillär, z.T. mit einer gewissen Granulierung beschrieben, wobei genauere Untersuchungen zeigen, daß die Fixierung und der dabei verwendete Puffer entscheidenden Einfluß auf die Ausbildung dieser Feinstruktur haben (SIMSON, 1977; SIMSON et al., 1978).

Da das Ergebnis von modifizierter EBR und Kontrollreaktion den fibrillären Inhalt der Granula der AZ als Äquivalent der lichtmikroskopisch EBR-positiven Strukturen ausweist, kann geschlos-

sen werden, daß diese Struktur ein morphologisches Gegenstück für die biochemisch nachgewiesenen Glykoproteine ist.

Einen weiteren Versuch, Eisenatome zunächst über einen "Vorläufer" des eigentlichen Reagenzes ins Gewebe einzuführen, stellt die Blockinkubation in Eisenrhodanidkomplexlösung dar. Obwohl diese Verbindung offensichtlich gut diffundiert, führt eine bei hoher Temperatur stattfindende Dissoziation und Umwandlung des Eisens zum Oxidhydrat nicht zu einer Darstellung der Granula der AZ. Eine unspezifische Bindung von Ferri-Ionen durch eine evtl. auftretende Dissoziation des Komplexes beim Eindringen kommt nicht in Betracht. Die Bindung freier Fe^{+++}-Ionen kann nach Vorinkubation in Ammoniumrhodanidlösung nicht zustande kommen, da durch diese Maßnahme immer SCN-Ionen im Überschuß vorhanden sind. Das gilt auch für eine mögliche Dissoziation bei der Nachbehandlung, wenn der Flüssigkeit für die Hydrolyse NH_4SCN zugesetzt wird. Denkbar ist aber, daß trotz des Rhodanidüberschusses sich ein- oder zweifach positiv-geladene Komplexe (HOLLEMANN und WIBERG, 1971) bilden, die dann eine Bindung eingehen, oder daß der Komplex selbst eine große Affinität für eine bestimmte Komponente in Kern und Zytoplasma besitzt. Letztere Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß der Reaktionsausfall völlig unabhängig von Variationen des Verfahrens ist.

Somit ist abschließend festzustellen, daß eine modifizierte Eisenbindungsreaktion angegeben werden kann, die

1. an die Bedingungen der elektronenmikroskopischen Präparation angepaßt ist;

2. im elektronenmikroskopischen Bereich Strukturen aufgrund ihres Gehaltes an sauren Gruppen kontrastiert;

3. wegen der ausgeprägten unspezifischen Einlagerung von Eisenatomen aber Kontrollreaktionen zur Identifizierung dieser Substanzen erfordert.

Modifizierte EBR:

Präparation kleiner Gewebeblöcke	(1)
Fixieren/Spülen	(2)
0.5% $FeCl_3$ x 6 H_2O in Äthanol bei RT 1 h oder länger	(3)
aqua dest 100° für 20'	(4)
aqua dest RT für 2'	(5)
Entwässern/Einbetten	(6)
Schnitte 2/3% $K_4Fe(CN)_6$ + 2/3% HCL 10' (nur LM)	(7)

Die Reaktion ist als Eisenbindungsreaktion zu bezeichnen, da sie nicht nur im Lichtmikroskop ein der herkömmlichen EBR entsprechendes Verteilungsmuster des Reaktionsproduktes zeigt, sondern auch das gleiche Nachweisreagenz,nämlich Ferrioxidhydrat verwendet wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Eisenbindungsreaktion (EBR) könnte aufgrund grundsätzlicher Überlegungen sowohl in der Licht- als auch in der Elektronenmikroskopie für den histochemischen Nachweis saurer Glykoproteine eingesetzt werden. Ihrer breiten Anwendung im ultrastrukturellen Bereich steht jedoch entgegen, daß das Reagenz (Ferrioxidhydrat) wegen seiner geringen Penetrationsfähigkeit für die Kontrastierung am Block wie am Ultradünnschnitt wenig geeignet erscheint.

Um prinzipielle Bedingungen für die Blockinkubation mit Ferrioxidhydratsol zu erfassen, wird zunächst die Größenverteilung der kolloidalen Partikel und der Einfluß einer Ferri-Ionen-Beimischung zum Sol bestimmt, darüberhinaus eine für das Substrat, die Gl. submandibularis der Ratte, geeignete Fixierung gesucht. Diese Untersuchungen ergeben, daß

1. eine Penetration des Plasmalemms durch das Ferrioxidhydratsol möglich erscheint;

2. auch die üblichen Solpräparationen erhebliche Mengen Fe^{+++}-Ionen enthält, die bei Versuchen zur Blockinkubation Quelle von Fehlinterpretationen sein können;

3. nur nach Aldehydfixierungen, die nicht Glutardialdehyd und Cacodylatpuffer gemeinsam enthalten, eine positive EBR an der Gl. submandibularis der Ratte zu erwarten ist.

Es wird auf zwei verschiedenen Wegen versucht, eine Darstellung intrazytoplasmatischer Strukturen durch Blockkontrastierung mit Ferrioxidhydrat zu erhalten:

1. Der Zusatz von Schutzkolloiden oder kleinen bipolaren Molekülen soll die Koagulabilität des Eisenoxidhydratsols herabsetzen und dadurch die Penetrationsfähigkeit erhöhen.

2. Die für den Kontrast notwendigen Eisenatome werden als eine gut diffusible Verbindung in das Gewebe gebracht, um in einem zweiten Schritt unmittelbar am potentiellen Bindungsort in das Eisenoxidhydrat umgewandelt zu werden.

Folgende Vorschrift für die Blockkontrastierung ergibt in der lichtmikroskopischen Abbildung eine Verteilung des Reaktionsproduktes, die dem Ergebnis der herkömmlichen EBR entspricht: Kleine fixierte Gewebeblöcke werden in einer äthanolischen Eisenchloridlösung inkubiert und anschließend 20 Min. mit aqua dest von 100°C behandelt.

Für die Identifizierung saurer Substanzen im elektronenoptischen Präparat muß dieses Verfahren mit Kontrollreaktionen kombiniert werden, die eine Abrenzung gegen unspezifisch kontrastierte Strukturen ermöglichen.

LITERATUR

ADAMS, C.W.M. and O.B. BAYLISS: Histochemistry of myelin VII. Analysis of lipid-protein relationships and absence of acid mucopolysaccharide.
J. Histochem. Cytochem. 16, 119-127 (1968)

ARNOLD, M.: Histochemie. Einführung in Grundlagen und Prinzipien der Methoden.
Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1968

ARNOLD, M.: Die Verwendbarkeit von Metallsolen zum elektronenmikroskopischen Nachweis von sauren Mucopolysacchariden.
Acta histochem. Suppl. 10, 149-163 (1971)

ARNOLD, M. und G. HAGER: Versuche zur elektronenmikroskopischen Darstellbarkeit saurer Mucopolysaccharide mit kolloidalen Eisenlösungen. Histochemie 17, 312-318 (1969)

ARNOLD, M. und Ch. KLESSEN: Informationswert histochemischer Untersuchungen. Acta histochem. Suppl. 14, 79-90 (1975)

BAKER, B.L., CLAPP, H.W. and J.A. LIGHT: Hormonal influences on the cytology and physiology of salivary glands.
In: Salivary glands and their secretions (eds. L.M. SREENBY, J. MEYER), Oxford etc.: Pergamon Press 1964; pp. 63-81

BARTHEL, J.: Leitfähigkeit von Elektrolytlösungen.
Angew. Chemie 80, 253-271 (1968)

BARTHEL, J.: Ionen in nichtwäßrigen Lösungen.
Darmstadt: Steinkopff 1976

BATEL, W.: Einführung in die Korngrößenmeßtechnik. 3. Aufl.
Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1971

BEHNKE, O.: Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet. Anat. Rec. 158, 121-138 (1967)

BELANGER, L.F.: Comparisons between different histochemical and histophysical techniques as applied to mucus-secreting cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 106, 364-378 (1963)

BELANGER, L.F.: Autoradiographic visualization of S^{35} incorporation and turnover by the mucus glands of the gastro-intestinal tract and other soft tissues of rat and hamster. Anat. Rec. 118, 755-771 (1954)

BOERNER-PATZELT, D.: Die Mundspeicheldrüsen des Goldhamsters. Anat. Anz. 102, 317-332 (1956)

BOGART , B.I.: The effect of aging on the rat submandibular gland: An ultrastructural, cytochemical and biochemical study. J. Morph. 130, 337-351 (1970)

BOGART , B.I.: Secretory dynamics of the rat submandibular gland. An ultrastructural and cytochemical study of the isoproterenol-induced secretory cycle. J. Ultrastruct. Res. 52, 139-155 (1975)

BRADLEY, D.E.: Techniques for mounting, dispersing and disintegrating specimens. In: Techniques for electron microscopy (ed. D.H. KAY), 2nd edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1965, pp. 75-95

CANTIN, M. and S. BENCHIMOL: Localization and characterization of carbohydrates in adrenal medullary cells. J. Cell Biol. 65, 463-469 (1975)

CIOFI LUZZATO, A., G. PROCICCHIANI and G. ROSATI: Rat submaxillary gland: An electron microscope study of the secretory granules of the azinus.
J. Ultrastruct. Res. 22, 185-194 (1968)

CURRAN, R.C.: The histochemistry of mucopolysaccharides.
Intern. Rev. Cyt. 17, 149-212 (1964)

CURRAN, R.C. and A.E. CLARK: The use of the colloidal-iron method for acid mucopolysaccharides in electron microscopy. Biochem. J. 90, 2P (1964)

CURRAN, R.C., A.E. CLARK and D. LOVELL: Acid mucopolysaccharides in electron microscopy. The use of the colloidal iron method. J. Anat. 99, 427-434 (1965)

DOREY, G. and K.D. BHOOLA: Ultrastructure of acinar cell granules in mammalian submaxillary glands.
Z. Zellforsch. 126, 320-334 (1972)

DOUGHERTY, W.J. and M.M. LEE: Electron microscopic observations on glycerol-extracted rabbit muscles treated with dialysed iron at low pH. J. Ultrastruct. Res. 31, 1-15 (1970)

DRAGONETTI, C., M.C. VAN PETEGHEM, M. MAREEL et L. VAKAET: Mise en évidence de la présance d'acide sialique sur les membranes périphérique et intracytoplasmique de la cellule HeLa, par application de la réaction histochimique au fer colloidal.
C. R. Soc. Biol. (Paris) 168, 355-359 (1974)

DRAUS, F.J.: On a mucoid from the rat submaxillary gland.
Arch. oral Biol. 9, 223-225 (1964)

EDELMANN, K.: Lehrbuch der Kolloidchemie, Bd. 1. Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften 1962

FAVA DE MOREAS, F. and B.L. BAKER: The influence of norethynodrel on sialic acid content of the rat submandibular gland. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 615-619 (1972)

FAVA DE MOREAS, F. and J. NICOLAU: Aging effects on sialic acids concentration of submandibular-sublingual glands of rats. Naturwiss. 24, 711 (1966)

FOLCH, J., M. LEES and G.H. SLOANE STANLEY: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509 (1957)

FREUNDLICH, H.: Kapillarchemie. Eine Darstellung der Chemie der Kolloide und verwandter Gebiete. Bd. II, 4. Aufl. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1932

FUKUDA, M.: Histochemical studies on the rat submaxillary gland during post-natal development. Histochemie 8, 342-354 (1967)

GASIC, G. and L. BERWICK: Hale stain for sialic acid containing mucins; adaptation to electron microscopy. J. Cell. Biol. 19, 223-228 (1963)

GASIC, G.J., L. BERWICK and M. SORRENTINO: Positive and negative colloidal iron as cell surface electron stains. Lab. invest. 18, 63-71 (1968)

GEYER, G.: Vergleichende topochemische Untersuchungen mit der Reaktion nach Hale und ihrer Modifikation von G. Müller an einigen Organen und Geweben der weißen Ratte. Acta histochem. 5, 62-78 (1957)

GEYER, G.: Elektronenmikroskopische Histochemie, Teil 1: Nachweis- und Kontrastierungsmethoden für Kohlehydrate, Proteine und Aminosäuren, Nucleinsäuren, Lipide und Mineralstoffe. In: Handbuch der Histochemie Bd. I/3 (eds. W. GRAUMANN, K. NEUMANN) Stuttgart-New York: Gustav Fischer 1977

GEYER, G. und V. WATZIG: Ultrahistochemischer Nachweis saurer Mucosubstanz im Glomerulum der Rattenniere. Morph. Jb. 114, 150-159 (1969)

GEYER, G. and D. STIBENZ: Quantitative aspects of the colloidal iron reaction. Acta histochem. 50, 264-272 (1974)

GEYER, G., W. LINSS and D. STIBENZ: Porosity and surface area of anionic resins: Limitations in the employment of model substrates for the colloidal iron reaction. Acta histochem. 54, 42-47 (1975)

GOTHE, U.: Ein Beitrag zur Standardisierung der kolloidalen Eisenbindungsreaktion. Acta histochem. 64, 71-77 (1979)

GRAD, B. and C. LEBLOND: The necessity of testes and thyroid hormones for the maintenance of the serous tubules of the submaxillary glands in the male rat. Endocrin. 45, 250-266 (1949)

GRAUMANN, W. und W. CLAUSS: Weitere Untersuchungen zur Spezifität der histochemischen Polysaccharid-Eisenreaktion. Acta histochem. 6, 1-7 (1958)

HALE, C.W.: Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissue. Nature (Lond.) 157, 802 (1946)

HASHIMOTO, Y., S. TSUIKI, G. QUINTARELLI and W. PIGMAN: A comparison of submaxillary glands of humans, cattle, dogs and rats. Biochim. Biophys. Acta 48, 404-406 (1961)

HEYMANN, E.: Die langsame Hydrolyse von Eisenchlorid. Z. anorg. u. allg. Chem. 171, 19-41 (1928)

HOLLMANN, K.H. et J.M. VERLEY: La glande sous-maxillaire de la souris et du rat. Etude au microscope electronique. Z. Zellforsch. 68, 363-388 (1965)

HOLLEMANN, A.F. und E. WIBERG: Lehrbuch der anorganischen Chemie. Berlin: Walter de Gruyter 1971

HOSHINO, M. and K. YAMADA: Effects of digestion with condroitinases upon mucosaccharide staining of rabbit cartilage as revealed by electron microscopy. Histochemie 32, 221-229 (1972)

HULSER, P.-J.: Darstellung intracytoplasmatischer Glykoproteine mit einer modifizierten Eisenbindungsreaktion. Acta histochem. Suppl. 21 im Druck

JACOBI, F. and C.R. LESSON: The post-natal development of the rat submaxillary gland. J. Anat. 93, 201-216 (1959)

JIRGE, S.K.: A puzzling feature of colloidal iron positive and alcian blue negative material. Histochemie 22, 82-84 (1970)

KARNOVSKY, M.J.: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. J. Cell. Biol. 35, 213-236 (1967)

KERYER, G., G. HERMAN and B. ROSSIGNOL: Mucin of the rat submaxillary gland: Influence of the animals sex and age on the composition of its glucidic fraction. Biochim. Biophys. Acta 297, 186-191 (1973)

KIM, S.K., S.S. HAN and C.E. NASJLETI: The fine structure of secretory granules in submandibular glands of the rat during early postnatal development. Anat. Rec. 168, 463-467 (1970)

KLESSEN, Ch.: Zum Nachweis von Sialinsäure enthaltenden Glykoproteinen in den Mucoidzellen der Adenohypophyse der Ratte. Histochemie 35, 297-306 (1973)

KOFOED, J.A., H.M. CURBELO and A.B. HOUSSAY: Acid glycosaminoglycans and sialic acid content in salivary glands of rats. J. Dent. Res. 48, 555-558 (1969)

KOSTULAK, A., K. KOZLOWSKA and K. KILKOWSKA: The effect of ACTH and cortisone on the carbohydrate-protein complexes of salivary glands of white rat. Acta histochem. 42, 61-67 (1972)

KRECKE, F.W.: Die Dissociations-Erscheinungen wässeriger Lösungen von Eisenchlorid. J. pr. Ch. 3, 286-306 (1871)

KUIJPER-LENSTRA, A.H. and M.F. KRAMER: Rate of protein synthesis in rat salivary gland cells after pilocarpine or feeding. I. Rate of (glyco)protein secretion from cells of mixed salivary glands. Cell tissue res. 164, 435-446 (1975)

KURTZ, S.M.: The salivary glands. In: Electron Microscopic anatomy (ed. S.M. KURTZ) New York-San Francisco-London: Academic Press 1964, pp. 97-122

LESSON, C.R. and F. JACOBY: An electron microscopic study of the rat submaxillary gland during its postnatal development and in the adult.
J. Anat. (Lond.) 93, 287-295 (1959)

LEV, R.: Histochemistry. In: The Glycoconjugates Vol. I/2. Methods of analysis and structural determination (eds.: M.I. HOROWITZ u. W. PIGMAN), New York-San Francisco-London: Academic Press 1977, pp. 35-50

LEV, R. and A. GERARD: The histochemical demonstration of protein in epithelial mucins.
J. R. Microsc. Soc. (3), 87, 361-373 (1967)

LILLIE, R.D.: Histopathologic technic and practical histochemistry. 2nd ed., New York-Toronto-Sidney-London: McGraw-Hill Book Company 1954

LILLIE, R.D.: The Nile blue reaction of peptic gland zymogen granules. The effect of methylation and alkali demethylation. J. Histochem. Cytochem. 6, 130-132 (1958)

LILLIE, R.D., L. VACCA and P. PIZZOLATO: Hydroxy-ferric ions in histochemistry. Iron ion hydroxylation and histotopochemistry of tissue iron uptake.
J. Histochem. Cytochem. 21, 161-165 (1973)

MARTINEZ-PALOMO, A.: The surface coats of animal cells.
Int. Rev. Cytol. 29, 29-75 (1970)

MARTINEZ, J.R., E. ADELSTEIN, O. QUISSEL and G.J. BARBERO: The chronically reserpinized rat as a possible model for cystic fibrosis. I. Submaxillary gland morphology and ultrastructure. Pediatr. Res. 9, 463-469 (1975)

MATUKAS, V.J., B.J. PANNER and J.L. ORBISON: Studies on ultrastructural identification and distribution of protein-polysaccharide in cartilage matrix. J. Cell Biol. 32, 365-377 (1967)

MCCRACKEN, M.D. and W.J. BARCELLONA: Electron histochemistry and ultrastructural localization of carbohydrate-containing substances in the sheath of VOLVOX. J. Histochem. Cytochem. 24, 668-673 (1976)

MOSCHERA, J. and W. PIGMAN: The isolation and characterization of rat sublingual mucus-glycoprotein. Carboh. Res. 40, 53-67 (1975)

MOWRY, R.W.: Improved procedure for the staining of acidic polysaccharides by Müller's colloidal (hydrous) ferric oxide and its combination with the Feulgen and the periodic acid-Schiff reactions. Lab. Invest. 7, 566-576 (1958)

MOWRY, R.W.: Minimizing non selective and variable staining of acid carbohydrates when (Krecke's) colloidal iron is used in Hale's reaction. J. Histochem. Cytochem. 9, 606-610 (1961)

MOWRY, R.W.: a) The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue G8X and their combination with the periodic acid-Schiff reaction. Ann. N. Y. Acad. Sci. 106, 402-403 (1963)

MOWRY, R.W.: b) Current status of the colloidal iron stain and alcian blue (8Gx) for the coloration of complex carbohydrates with acid groups. Ann. Histochim. Suppl. 157-165 (1963)

MÖLLER, G.: Über eine Vereinfachung der Reaktion nach Hale (1946). Acat histochem. 2, 68-70 (1955)

MÖLLER, G.: Kolloidchemische Untersuchungen zur Eisenhydroxyd-solreaktion. Acta histochem. 17, 61-72 (1964)

MÖLLER, G. und N. OLLENNU: Über die Blockierung der Alzianblau und Astrablaufärbung durch Eisenhydroxydsol. Acta histochem. 17, 348-352 (1964)

NARASIMHAM, C. and D.N. KAMAT: An interesting case of colloidal iron positivity. Histochemie 21, 286-288 (1970)

NEMETSCHEK-GANSLER, H., G. BERG und O. SCHILLER: Erfahrungen mit einer neuen Fixierungs- und Einbettungsmethode für die Routinehistologie. Beitr. Path. 147, 201-206 (1972

NETTER, H.: Theoretische Biochemie. Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensvorgänge. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959

OVERBEEK, T.G.: Colloid stability in aqueous and non-aqueous media. Introductory paper. Discuss. Faraday Soc. 42, 7-13 (1966)

PEARSE, A.G.E.: Histochemistry, theoretical and applied. 3rd ed., Vol. 1. London: J. a. A. Churchill Ltd. 1968

PETERSON, M. and C.P. LEBLOND: Synthesis of complex carbohydrates in the Golgi region, as shown by radioautography after injection of labeled glucose. J. Cell. Biol. 21, 143-148 (1964)

PUVION, E. and W. BERNHARD: Ribonucleoprotein components in liver cell nuclei as visualized by cryoultramicrotomy. J. Cell Biol. 67, 200-214 (1975)

QUINTARELLI, G. and H.H. CHAUNCEY: Metachromatic reactivity of mammalian submaxillary glands. Arch. oral Biol. 2, 162-166 (1960)

QUINTARELLI, G., S. TSUIKI, Y. HASHIMOTO and W. PIGMAN: Studies of sialic acid containing mucins in bovine submaxillary and rat sublingual gland. J. Histochem. Cytochem. 9, 176-183 (1961)

RADLEY, J.M.: Ultrastructural changes in the rat submaxillary gland following isoprenaline. Z. Zellforsch. 97, 196-211 (1969)

RAMBOURG, A.: Morphological and histochemical aspects of glycoproteins at the surface of animal cells. Int. Rev. Cytol. 31, 57-114 (1971)

RAMBOURG, S.: Staining of intracellular glycoproteins. In: Electron microscopy and cytochemistry (eds. E. WISSE, W.Th. DAEMS, I. MOLENAAR, P. VAN DUIJN), Amsterdam: North-Holland Publishing Co. 1973, pp. 245-253

RAVETTO, C., F. GALLUZO and R. SIERVO: On the presence of sialic acid and sulfate groups in rat submaxillary gland. J. Histochem. Cytochem. 14, 114-115 (1966)

SABATINI, D.D., K. BENSCH and R.J. BARRNETT: Cytochemistry and electron microscopy, the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell. Biol. 17, 19-58 (1963)

SCOTT, B.L. and D.C. PEASE: Electron microscopy of salivary and lacrimal gland of the rat.
Am. J. Anat. 104, 115-140 (1959)

SEIFERT, G.: Experimentelle Veränderungen der färberischen Sekretdarstellung in den Speicheldrüsen der Ratte.
Acta histochem. 19, 177-187 (1964)

SHACKLEFORD, J.M. and C.E. KLAPPER: Structure and carbohydrate histochemistry of mammalian salivary glands.
Am. J. Anat. 111, 25-48 (1962)

SIMSON, J.A.V.: The influence of fixation on the carbohydrate cytochemistry of rat salivary gland secretory granules.
Histochem. J. 9, 645-657 (1977)

SIMSON, J.A.V., B.J. HALL and S.S. SPICER: Histochemical evidence for lipoidal material in secretory granules of rat salivary glands. Histochem. J. 5, 239-254 (1973)

SIMSON, J.A.V., R.M. DOM, P.L. SANNES and S.S. SPICER: Morphology and cytochemistry of acinar secretory granules in normal and isoproterenol-treated rat submandibular glands. J. Micr. 113, 185-203 (1978)

SLOMIANY, A., C. ANNESE and B.L. SLOMIANY: The glycosphingolipids of rat sublingual and submaxillary glands.
Biochim. Biophy. Acta 441, 316 - 326 (1976)

SONNTAG, H.: Lehrbuch der Kolloidwissenschaften.
Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften 1977

SONNTAG, H. und K. STRENGE: Koagulation und Stabilität disperser Systeme.
Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften 1970

SONNTAG, W. und M. ARNOLD: Funktionsentwicklung der Lunge des Goldhamsters. Acta histochem. 45, 21-36 (1973)

SPICER, S.S.: A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. J. Histochem. Cytochem. 8, 18-36 (1960)

SPICER, S.S. and J. DUVENCI: Histochemical characteristics of mucopolysaccharides in salivary and exorbital lacrimal glands. Anat. Rec. 149, 333-357 (1964)

SPICER, S.S. and L. WARREN: The histochemistry of sialic acid containing mucoproteins. J. Histochem. Cytochem. 8, 135-137 (1960)

STOCKEM, W.: Pinozytose und Bewegung von Amöben. III. Die Funktion des Golgiapparates von Amoeba proteus und Chaos chaos. Histochemie 18, 217-240 (1969)

STOWARD, P.J.: The histochemical reactions of methanolic thionyl chloride with the anionic groups and basic protein component of sulphated mucosubstances. J. R. Microsc. Soc. (3) 88, 119-131 (1968)

SWIFT, H. and B.J. ADAMS: Simple methods for nucleic acids and acid mucopolysaccharide localization in electron micrographs. 5th Int. Congr. Electr. Micr. (Philadelphia) II: 0-4 (1962)

TAMARIN, A. and L.M. SREEBNY: The rat submaxiallary salivary gland. A correlative study by light and electron microscopy. J. Morph. 117, 295-352 (1965)

TAYLOR, H.E. and A.M. SAUNDERS: The association of granulation tissue ground substance with fibroblastic activity. Am. J. Path. 32, 617 (1956)

TAYLOR, P.W.Jr., K.C. RICHARDSON, P.M. RODDY and E. TITUS: A new effect of reserpine accumulation of glycoprotein in the submaxillary gland. J. Pharmacol. exp. ther. 156, 483-491 (1967)

TERNER, J.Y.: Histochemical alkylation: A study of methyl iodide and its effect on tissues. J. Histochem. Cytochem. 12, 504-511 (1964)

THIERY, J.P.: Cytochimie sur coupe fine des mucopolysaccharides acides après inclusion dans les résines epoxy. 7th Int. Congr. Electr. Micr. (Grenoble) 7, 557-578 (1970

TOCK, E.P.C. and PEARSE, A.G.E.: Preservation of tissue mucins by freeze-drying and vapour fixation. J. R. Micr. Soc. (3) 84, 519-537 (1965)

TUPPY, H. and A. GOTTSCHALK: The structure of sialic acids and their quantitation. In: Glycoproteins, part A (ed. A. GOTTSCHALK), Amsterdam-London-New York: Elsevier Publ. Co. 1972 , pp. 403-449

TUROLLA, E. and M. MARTINAZZI: Histochemical studies on the submaxillary gland of the rat. Acta histochem. 15, 16-26 (1963)

ULICH, H. und W. JOST: Kurzes Lehrbuch der physikalischen Chemi 16. Aufl., Darmstadt: Steinkopff 1966

VILLA, N. and F. FAVA DE MOREAS: Histochemical detection of mucopolysaccharides in the major salivary glands of the rat. Ann. Histochim. 9, 251-264 (1964)

WARREN, L. and S.S. SPICER: Biochemical and histochemical identification of sialic acid containing mucin of rodent vagina and salivary glands.
J. Histochem. Cytochem. 9, 400-408 (1961)

WETZEL, M.G., B.K. WETZEL and S.S. SPICER: Observations on the fine structural localization of acid mucosubstances with iron solutions.
J. Histochem. Cytochem. 13, 702-703 (1965)

WETZEL, M.G., B.K. WETZEL and S.S. SPICER: Ultrastructural localization of acid mucosubstances in the mouse colon with iron-containing stains. J. Cell Biol. 30, 299-315 (1966)

YARDLEY, J.H. and G.D. BROWN: Fibroblasts in tissue culture. Use of colloidal iron for ultrastructural localization of acid mucopolysaccharides.
Lab. Invest. 14, 501-513 (1965)

YOUNG, J.A. and E.W. VAN LENNEP: The morphology of salivary glands. London-New York-San Francisco: Academic Press 1978

TABELLE 1

Fixans			Puffer		
Glutardi-aldehyd	Formal-dehyd	Gesamt	Phosphat-puffer	Cacodylat-puffer	Gesam
4%		4%	0.095 M	0.005 M	0.1 M
4%		4%	0.09 M	0.01 M	0.1 M
4%		4%	0.06 M	0.04 M	0.1 M
1.6 %	2.4 %	4%		0.1 M	0.1 M
0.4 %	3.6 %	4%		0.1 M	0.1 M
0.16%	3.84%	4%		0.1 M	0.1 M

Fixierungen mit unterschiedlichen Anteilen von Glutardialdehyd bzw. Cacodylatpuffer

TABELLE 2

Untersucher	Ergebnis
BELANGER, 1954, 1963	Aufnahme S^{35}-markierten Sulfats
SPICER u. WARREN, 1960	nicht sialidaseempfindliche saure Gruppen
WARREN u. SPICER, 1961	sulfatfrei; stark saure Carboxylgruppen, nicht sialidaseempfindlich
TUROLLA u. MARTINAZZI, 1963	sulfatfrei; stark saure Carboxylgruppen
PETERSON u. LEBLOND, 1964	keine Aufnahme S^{35}-markierten Sulfats
SPICER u. DUVENCI, 1964	saure Gruppen, nicht sialidaseempfindlich nach KOH-Behandlung
TOCK u. PEARSE, 1965	sulfatiertes Mucin, nicht sialidaseempfindlich
RAVETTO et al., 1966	keine Sialinsäure
PEARSE, 1968	sulfatiertes Mucin
KOSTULAK et al., 1972	Sialinsäure
KUIJPER-LENSTRA u. KRAMER, 1975	Aufnahme H^3-markierten Leucins, Ort der Glykoproteinsynthese

Ergebnisse histochemischer Untersuchungen an den Sekretgranula der AZ hinsichtlich ihres Gehaltes an Sialinsäure bzw. Sulfat.

TABELLE 3

Untersucher	Ergebnis	Bezugsgröße	Umrechnung in µM/g Feuchtgew.
SPICER u. WARREN, 1960	2 µM/g FG Sialinsäure	Drüsenfeuchtgewicht (FG)	2
HASHIMOTO et al., 1961	1.5 mg/g FG Sialinsäure	Drüsenfeuchtgewicht	5.6
DRAUS, 1964	9.4% Sialinsäure	Mucoid = 0.5% d. FG	1.8
FAVA DE MOREAS und NICOLAU, 1966	2.8 mg/g FG Sialinsäure	Submandibularis + Sublingualis gemeinsam	
RAVETTO, et al., 1966	1.41% Sulfat		
TAYLOR et al., 1967	6.09 µM/g NANA	Drüsenfeuchtgewicht	6
KOFOED et al., 1969	3.7 µM/g Sialinsäure	Drüsenfeuchtgewicht	3.7
KERYER et al., 1973	32 µM Sialinsäure pro 100 µM Aminosäuren	Glykoprotein	
FAVA DE MOREAS und BAKER, 1976	2.3 µM/g Sialinsäure	Drüsenfeuchtgewicht	2.3
SLOMIANY et al., 1976	Monosialo- und Disialoganglioside 0.19 µM/g FG Monohexose- und Dihexosesulfatide 0.31 µM/g FG	Drüsenfeuchtgewicht	0.19 - 0.38 0.31

Biochemischer Nachweis sialinsäure- oder sulfathaltiger Substanzen in der Gl. submandibularis der

TABELLE 4

Untersucher	Bestimmungsmethode	Größe
CURRAN u. CLARK, 1964	EM	3 - 5 nm
REVEL u. HAY, 1964	EM	5 - 8 nm
CURRAN et al., 1965	EM	3 nm
YARDLEY u. BROWN, 1965	EM	3 - 9 nm
MATUKAS et al., 1967	EM	3 - 5 nm
ARNOLD u. HAGER, 1969	EM	10 - 100 nm
ARNOLD, 1971	Membranfilter	5 - 10 nm
eigene Ergebnisse	EM	2 - 8 nm

Größe der Eisenoxidhydratpartikel

ABBILDUNGSLEGENDEN

Abb. 1: Gl. submandibularis der Ratte.
1 µm-EFL-Schnitte, gleiche Belichtungszeiten und Reproduktionsbedingungen,
Fe-III-Nachweis am Schnitt, Abbildungsmaßstab 1:1200

a) Blockinkubation in 0.5%-iger wäßriger Eisenchloridlösung

b) wie a), zusätzlich Behandlung mit aqua dest. von 100°C für 20'

c) Blockinkubation in äthanolischer 0.5%-iger Eisenchloridlösung

d) wie c), zusätzlich Behandlung mit aqua dest. von 100°C für 20'

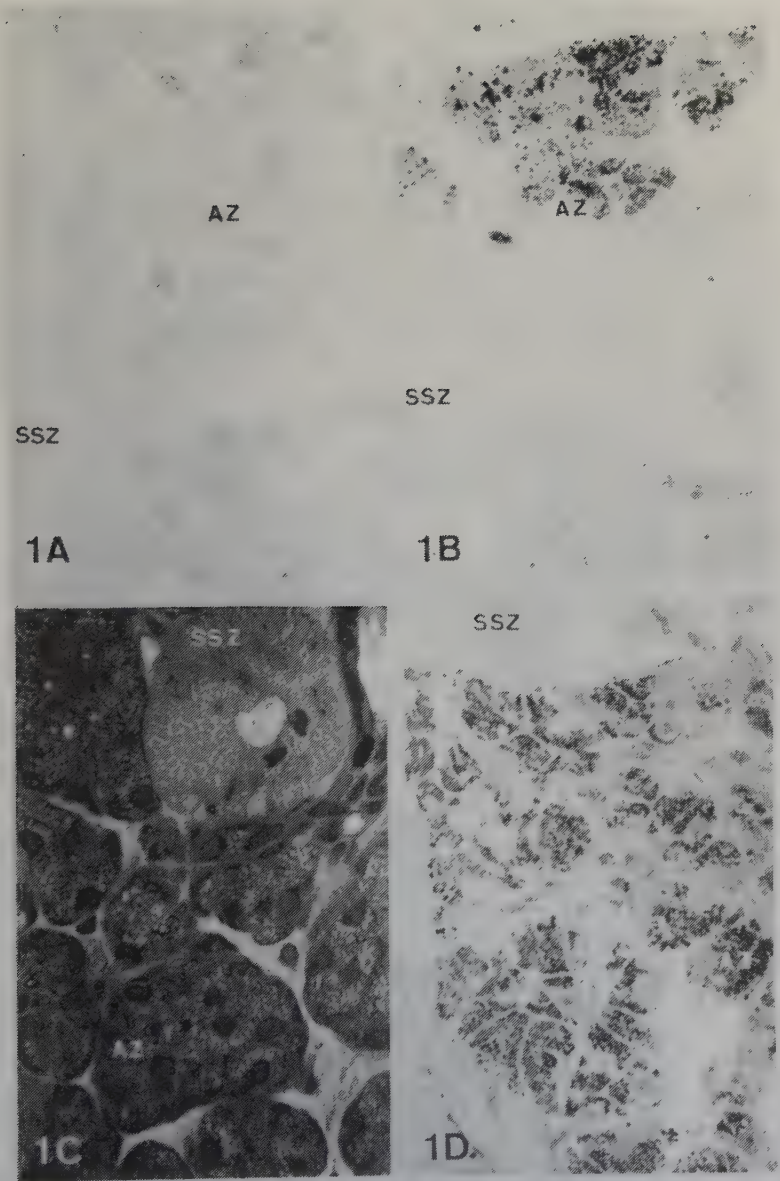
Abb. 2: Gl. submandibularis der Ratte.
Ultradünnschnitte, Abbildungsmaßstab 1:22400

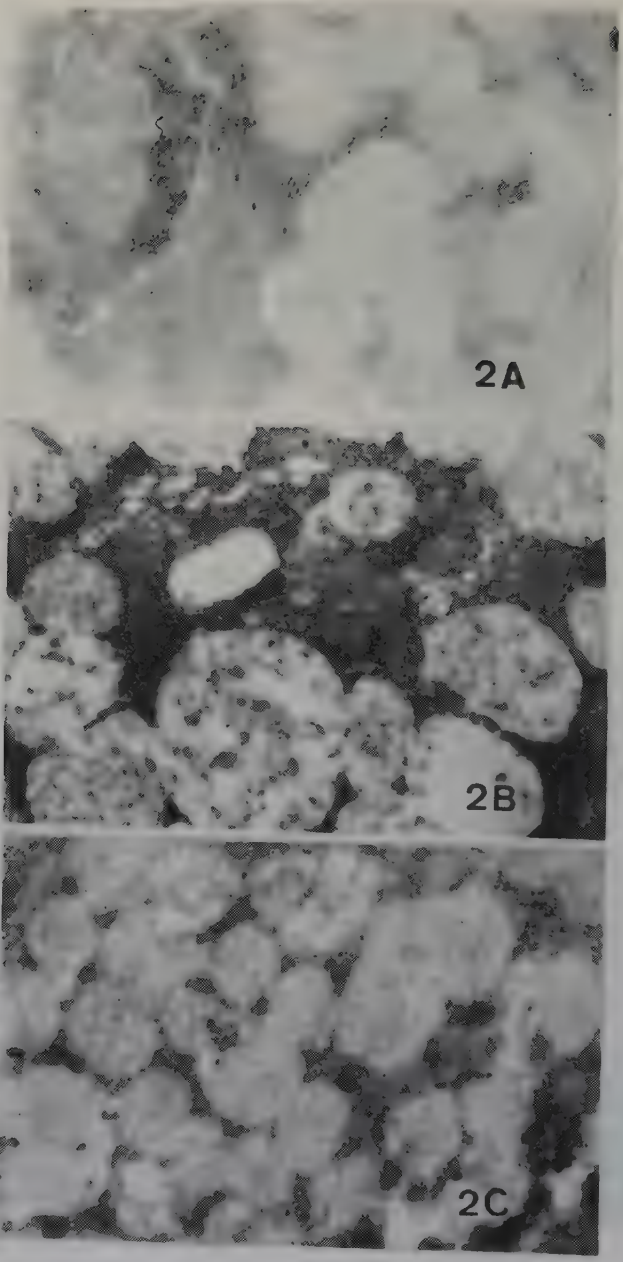
a) Blockkontrastierung mit 0.5%-iger wäßriger Eisenchloridlösung

b) wie a), zusätzlich Behandlung mit aqua dest. von 100°C für 20'

c) Blockkontrastierung mit 0.5%-iger äthanolischer Eisenchloridlösung, anschließend Behandlung mit aqua dest. von 100°C für 20'

Die angegebenen Abbildungsmaßstäbe gelten für die Originalarbeit im Format DIN A 4.


AZ
AZ
SSZ
SSZ
1A
1B
SSZ
SSZ
AZ
1C
1D


2A
2B
2C

LEBENSLAUF

Am 2. August 1954 wurde ich, Paul-Jürgen Hülser, als Sohn des Geschäftsführers Paul Hülser und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. NUYKEN in Oberhausen geboren. 1957 zog unsere Familie nach Wuppertal-Elberfeld. Dort besuchte ich von 1961-1965 die Volksschule und anschließend das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium an der Bayreutherstrasse. Nach dem Abitur 1973 begann ich im Wintersemester 1973/74 mit dem Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf. Dort legte ich im Sommer 1975 die ärztliche Vorprüfung, im Sommer 1976 den 1. Teil der ärztlichen Prüfung ab. Ab dem Wintersemester 1976/77 setzte ich mein Medizinstudium an der Universität Tübingen fort und absolvierte 1979 den 2. Teil der ärztlichen Prüfung. Am 18.4.80 schloß ich mein Medizinstudium mit dem 3. Teil der ärztlichen Prüfung in Tübingen ab.